

<p>90-311416/41 B04 D16 E23 LENI 20.11.87 LENINGRAD LENSOVET TECH *SU 1530-628-A 20.11.87-SU-331426 (23.12.89) C07d-235/20 C09k-11/06 New fluorescent dye for DNA studies - comprises phenyl-benzimidazolyl-N-di:methylamino-propyl-benzimidazole-carboxamide trihydrochloride C90-134904 </p>	<p>B(4-B4A1, 6-D5, 11-C7B3, 12-K4A) D(5-H9) E(6-D5) N(6-C)</p>
<p>New 2-(2-phenyl-5 (6)- benzimidazolyl)- N-(3-dimethylamino propyl)-5(6)- benzimidazole carboxamide trihydrochloride has formula (I). (I) is obtd. by hydrogenation of 3-nitro-4-amino-N-(3-dimethylamino propyl) benzamide in the presence of Ni-Raney catalyst, at room temp., in methanol medium, followed by treatment of prod. with the hydrochloride of methoxyethyl iminoether of 2-phenyl-5(6)-benzimidazole carboxylic acid, with boiling for 5 hrs. The yield of (I) is 68%, m.pt. above 350 deg. C, and irradiation range within 350-450 nm at max. 387 nm. The intensity of fluorescence of cells coloured with the proposed dye (I) is in direct proportion to their DNA content. The emission band of (I) does not interfere with other fluorescence bands and the quantum yield is increased, compared to other known dyes of similar type. USE/ADVANTAGE - New cpd. (I) can be used in biology as a dye for DNA fluorimetry. New dye (I) has increased efficiency. Bul.47/23.12.89 (4pp Dwg. No. 0/0)</p>	<p>$(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}$</p> <p>(I)</p> <p>(sic)</p> <p>.3HCl</p>



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1530628 A1

(SD 4 C 07 D 235/20, С 09 К 11/06

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4331426/31-04

(22) 20.11.87

(46) 23.12.89. Бюл. № 47

(71) Ленинградский технологический
институт им. Ленсовета

(72) И.В. Склярова, А.В. Гарабаджиу,
О.Ф. Гинзбург, Ю.М. Розанов
и В.Н. Умецкая

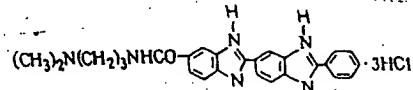
(53) 547.785.5 (088.8)

(56) Latt S.A., Wohleb S. Chromosoma,
1975, v.52, p. 297-316.

(54) ТРИГИДРОХЛОРИД 2-[2-ФЕНИЛ-5(6)-
БЕНЗИДАЗОЛИЛ]-N-(3-ДИМЕТИЛАМИНОПРО-
ПИЛ)-5(6)-БЕНЗИДАЗОЛКАРБОКСАМИДА
В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ДНК

(57) Изобретение относится к произ-
водным бис-бензидазолов, в частно-
сти к тригидрохлориду 2-[2-фенил-5(6)-
бензидазолил]-N-(3-диметиламинопро-
пил)-5(6)-бензидазолкарбоксамида,
который может быть использован в ка-
честве флуоресцентного красителя для

Изобретение относится к органичес-
кой химии, а именно к новому тригидро-
хлориду 2-[2-фенил-5(6)-бензидазо-
лил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-
бензидазолкарбоксамиду формулы



который может найти применение в ка-
честве красителя в методе ДНК-флуори-
метрии.

исследования ДНК в биологии. Цель
изобретения - создание более эффек-
тивных красителей указанного класса.
Синтез целевого соединения ведут гид-
рированием 3-нитро-4-амино-N-(3-ди-
метиламинопропил)бензамида в присут-
ствии Ni Ренея при комнатной темпера-
туре в среде метанола с последующей
обработкой гидрохлоридом-метоксиэти-
лового иминозифира 2-фенил-5(6)-бенз-
идазолкарбоновой кислоты при кипя-
чении (5 ч). Выход 68%, т.пл. >350°C,
брутто-формула $C_{26}H_{26}N_6O \cdot 3HCl$, область
излучения находится в пределах 350-
450 нм при $\lambda_{max} \approx 387$ нм. Интенсив-
ность флуоресценции клеток, окрашен-
ных этим красителем, пропорциональна
содержанию в них ДНК, причем в отли-
чие от известных ДНК-тропных флуорес-
центных зондов, это вещество имеет
структурированную эмиссионную полосу,
не перекрывающуюся другими флуорес-
центными метками, и более высокий
квантовый выход. 2 ил., 1 табл.

Цель изобретения - создание нового
ДНК-тропного зонда в ряду бис-бензими-
дазолов, обладающего структурирован-
ным спектром флуоресценции, расширяю-
щего спектральные возможности метода
ДНК-флуориметрии.

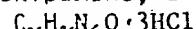
На фиг. 1 приведены спектры флуорес-
ценции препарата (I) и "Хекста-33258
в фосфатном буфере (M 0,05) при pH
6,8); на фиг. 2 - гистограммы распре-
деления окрашенных клеток тимуса мыши
по интенсивности флуоресценции.

(19) SU (11) 1530628 A1

При мер 1. Тригидрохлорид 2-[2-фенил-5(6)-бензимидазолил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-бензимидазолкарбоксамида.

Раствор 0,4 г (1,5 ммоль) 3-нитро-4-амино-N-(3-диметиламинопропил)бензамида в 30 мл метанола гидрируют при комнатной температуре и нормальном давлении в присутствии Ni Ренея (10 мас.%). После поглощения расчетного количества водорода раствор отфильтровывают в атмосфере аргона, упаривают метанол в вакууме, остаток растворяют в 30 мл ледяной уксусной кислоты. К полученному раствору добавляют 0,581 г (1,58 ммоль) гидрохлорида метоксиэтилового иминоэфира 2-фенил-5(6)-бензимидазолкарбоновой кислоты. Реакционную смесь кипятят 5 ч. Уксусную кислоту отгоняют в вакууме. Маслянистый остаток затирают до образования кристаллов в 30 мл 7 н. раствора хлористого водорода в изопропиловом спирте. Осадок отфильтровывают, промывают ацетоном. Выход 0,558 г (68%). Т.пл. 350°С.

Найдено, %: C 56,84; H 5,21; N 15,25; Cl 19,50. M⁺=438 (масс-спектрально, в виде основания)



Вычислено, %: C 56,99; H 5,33; N 15,34; Cl 19,41. M=438,5.

Основная область излучения полученного препарата (I) лежит в пределах 350-450 нм, $\lambda_{\text{max}} \approx 387$ нм.

Краситель "Хехст 33258" обладает следующими спектральными характеристиками: $\lambda_{\text{max}} \approx 465$ нм в основной области излучения 410-530 нм (фиг.1).

При мер 2. Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных препаратом (I) или Хехст-33258, пропорциональна содержанию в них ДНК. Гистограммы распределения окрашенных клеток тимуса мыши по интенсивности флуоресценции (фиг.2) идентичны для сравниваемых красителей.

Результаты определения долей клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла (G_0+G_1 , S и G_2+M), полученные при обработке 10 гистограмм для каждого красителя, даны в таблице.

Коэффициенты вариации пиков G_0+G_1 гистограмм невелики, что свидетельствует о высокой стабильности и надежности окрашивания. Таким образом, аналогично красителю Хехст-33258

препарат (I) может использоваться для количественной ДНК-цитометрии.

Предлагаемый препарат (I) обладает ярко выраженной нуклеотидной специфичностью. Результаты оценки относительной доли AT-пар в геноме двух животных (ящерицы и мыши), проведенной с помощью сравниваемых красителей, практически одинаковы. Таким образом, препарат (I) обладает нуклеотидной специфичностью AT-типа.

Характеристики Показатели для препарата

Хехст-33258 (I)

Параметры ДНК-гистограммы:

доля G_0+G_1 , %	$89,6 \pm 0,6$	$90,2 \pm 0,5$
доля S, %	$5,3 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,4$
доля G_2+M , %	$5,1 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,2$

Коэффициент вариации пика

G_0+G_1 , % $2,5 \pm 0,2$ $2,4 \pm 0,2$

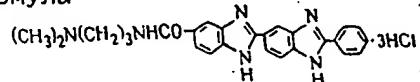
Относительная доля AT-пар в геноме ящерицы по сравнению с геномом мыши $0,793 \pm 0,015$ $0,774 \pm 0,016$

ATя/(AT+ГЦ)я
ATм/(AT+ГЦ)м

Предлагаемый препарат - тригидрохлорид 2-[2-фенил-5(6)-бензимидазолил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-бензимидазолкарбоксамида отличается от известных ДНК-тропных флуоресцентных зондов тем, что имеет структурированную эмиссионную полосу, не перекрывающуюся с аналогичными полосами известных флуоресцентных меток, и более высокий квантовый выход, что расширяет возможности многопараметрического анализа в клеточной биологии и биотехнологии.

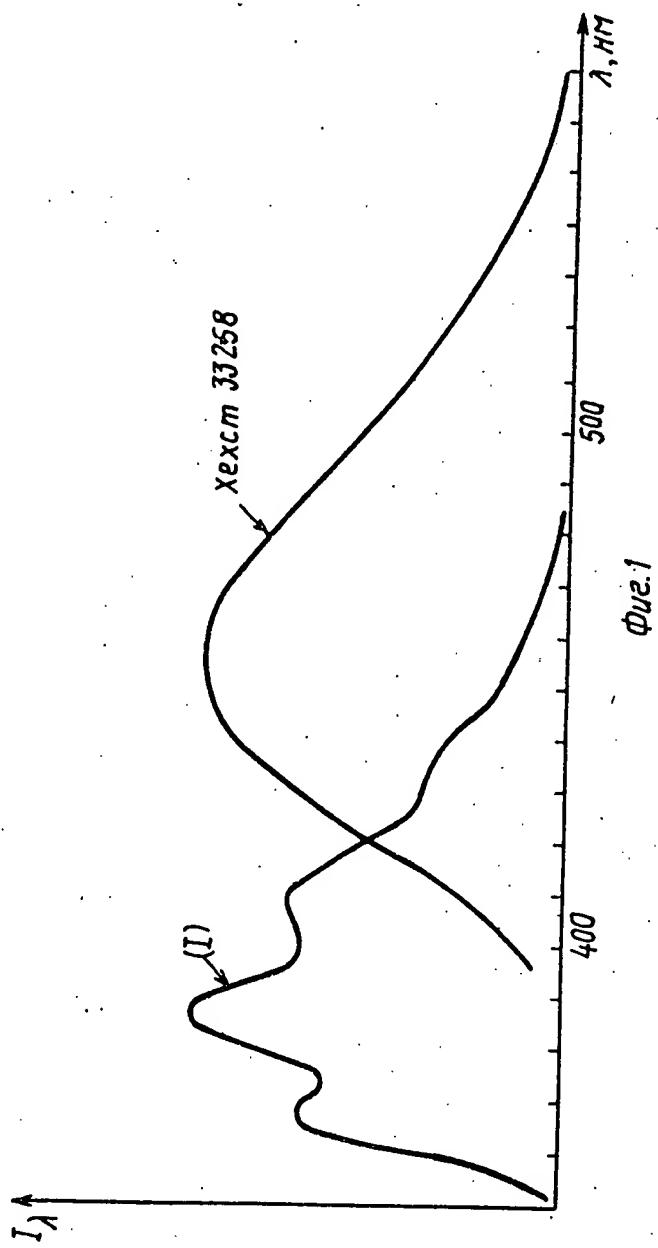
Ф о р м у л а изобретения
Тригидрохлорид 2-[2-фенил-5(6)-бензимидазолил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-бензимидазолкарбоксамида

Формулы

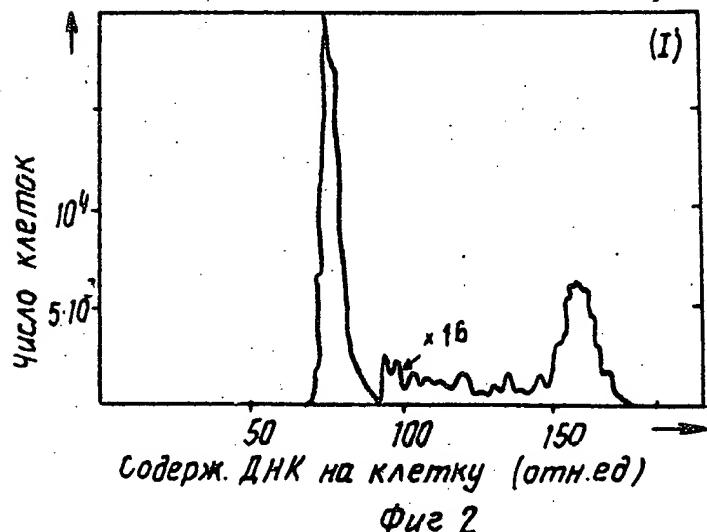
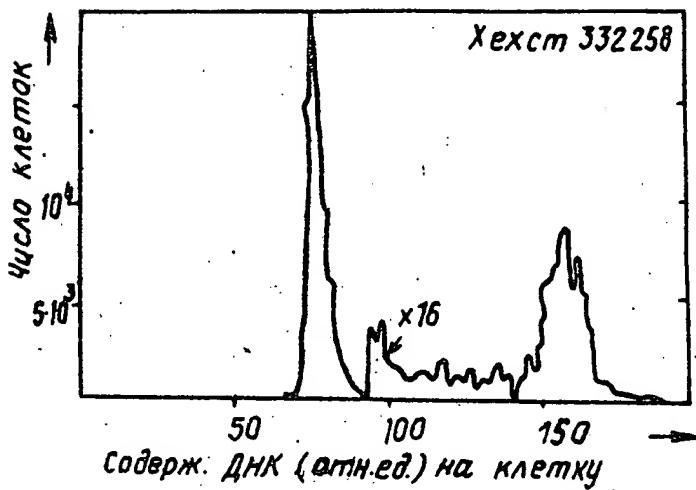


в качестве флуоресцентного красителя для исследования ДНК.

1530628



1530628



Фиг 2

Составитель Г.Жукова

Редактор Н.Гунько Техред М.Дидык

Корректор М.Кучерявая

Заказ 7862/27

Тираж 352

Подписьное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101